



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de la Reproducción en el Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)

Reproduction Study in the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*)

Autor/es

Celia García Fuentes

Director/es

Noelia González Orti
María Mercedes Serrano Serrano

Facultad de Veterinaria

2021

ÍNDICE

1.	RESUMEN/ ABSTRACT	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	5
4.	METODOLOGÍA.....	5
5.	RESULTADOS	5
5.1	ANATOMÍA REPRODUCTIVA FELINA	5
5.2	FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL LINCE.....	7
5.2.1	Hembra.....	7
5.2.1.1	Estudio histológico de CL de ciclo y CL persistente.....	10
5.2.1.2	Perfil hormonal de la hembra	11
5.2.1.3	Apareamiento, gestación y parto.....	13
5.2.2	Macho.....	14
5.2.2.1	Perfil hormonal del macho.....	15
5.3	INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL MANEJO DE LA ESPECIE.....	16
5.3.1	MONITORIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL.....	16
5.3.1.1	Evaluación del comportamiento	16
5.3.1.2	Monitorización hormonal de estrógenos y progesterona en heces y/u orina	17
5.3.1.3	Citología vaginal	18
5.3.2	MONITORIZACIÓN DE LA GESTACIÓN	18
5.3.2.1	Monitorización de PGFM en heces y orina	18
5.3.2.2	Monitorización de relaxina en orina	19
5.3.2.3	Ecografía abdominal.....	19
5.4	TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	21
5.4.1	TRATAMIENTOS HORMONALES	21
5.4.2	RECOLECCIÓN DE GAMETOS Y CRIOPRESERVACIÓN	22
5.4.3	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	23
5.4.4	FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i>	24
5.6.	PROGRAMA DE CRÍA PARA LA CONSERVACIÓN DEL LINCE IBÉRICO.....	26
6.	CONCLUSIONES	29
	CONCLUSIONS.....	29
7.	VALORACIÓN PERSONAL	30

8. BIBLIOGRAFÍA.....	30
----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

FIGURAS:

Figura 1: Distribución geográfica del lince Ibérico 2020.....	4
Figura 2: Vista lateral y dorsal del aparato reproductor de la gata.....	6
Figura 3: Ciclo reproductivo generalizado del gato doméstico.	9
Figura 4: Ciclo reproductivo anual generalizado del lince euroasiático.....	9
Figura 5: Esquema del ciclo ovárico del lince.....	13

IMÁGENES:

Imagen 1: Espículas córneas del pene del Lince Ibérico.....	7
Imagen 2: Ovarios del lince ibérico que contienen CL de ciclo y CL persistentes.....	11
Imagen 3: CL persistente de lince en ecografía.....	20

TABLAS:

Tabla 1: Censo población del lince Ibérico 2020.....	4
Tabla 2: Esquema comparativo de los CL en fase folicular y fase lútea del lince y otros felinos durante una época reproductiva.....	10
Tabla 3: Parámetros reproductivos en diferentes estadios reproductivos.....	13
Tabla 4: Rasgos fenotípicos, testiculares y espermáticos de lince ibérico recuperados <i>post mortem</i>	15
Tabla 5: Tabla resumen de las diferentes técnicas no invasivas para monitorización del lince y los aspectos a destacar de cada una de ellas.....	21
Tabla 6: Representación numérica de individuos fundadores que han sido capturados, ejemplares que han sido liberados y sueltas acumulativas del año 2014 a 2019.....	28

1. RESUMEN/ ABSTRACT

Estudio de la Reproducción en el Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)

El lince ibérico llegó a estar al borde de la extinción, pues se censaron menos de 100 individuos en el año 2004. Es por ello que surgió la necesidad de crear programas para su conservación, como el programa de cría, para el cual es necesario conocer cómo es la reproducción de este animal. Una de sus características fisiológicas más importantes, y que determina cómo se desarrollan tanto las técnicas de monitorización de los individuos a nivel reproductivo, como las técnicas de reproducción asistida, es la persistencia de cuerpos lúteos de forma fisiológica, que pueden permanecer en el ovario varios años. Los cuerpos lúteos persistentes liberan de forma continua progesterona, sin embargo, permiten que la hembra vuelva a ciclar mediante su involución funcional temporal. Los mecanismos de este proceso continúan en estudio y con ello, la mejora de las técnicas de monitorización y de reproducción asistida. Como ha quedado reflejado en estos últimos años, gracias a estos conocimientos y a la aplicación de las diferentes herramientas que conforman los programas de conservación, el lince ha descendido en la lista de la UICN de categoría de “en peligro crítico” a “en peligro”, pues el número de ejemplares ha aumentado significativamente.

Reproduction Study in the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*)

In 2004 the iberian lynx was at the verge of extinction, with a census of less than 100 individuals. This situation generates the necessity to create conservation programs, such as breeding programs, and for this the knowledge of their reproduction is necessary. One of the more important physiological characteristics, that conditions both the monitoring techniques of reproduction in different individuals and the development of assisted reproduction techniques, is the persistence of corpus luteum, that may remain in the ovaries for years. The persistent corpus luteum releases progesterone continuously, but allows the female to cycle throughout temporary functional involution. The mechanism of this process is still unknown, so it is being studied and with it, the improvement of the monitoring and assisted reproduction techniques. As the last few years have shown, the knowledge and application of the different tools that shape these conservationist programs, allow that the lynx has descended from its “critically endangered” position in the IUCN list to “endangered”, because of the significantly increased number of individuals.

2. INTRODUCCIÓN

El lince es un mamífero carnívoro de la familia *felidae*. Existen cuatro tipos de lince repartidos por el mundo: el lince ibérico (*Lynx pardinus*), situado exclusivamente en la Península Ibérica; el lince euroasiático (*Lynx lynx*), que habita tanto en Europa como en Asia; el lince rojo (*Lynx rufus*), presente en el sur América del Norte; y el lince canadiense (*Lynx canadensis*), también presente en América del Norte, pero más en el norte (Canadá, Alaska).

En este trabajo se va tratar una especie en concreto, el lince ibérico, caracterizado por ser unos de los mamíferos más amenazados del planeta.

En los últimos años se ha observado una evolución decreciente acusada en la población del lince ibérico, de modo que el número de individuos se ha visto reducido de 1000 a menos de 100 ejemplares en un periodo de 24 años (1980 – 2004). En el año 1980 se estimó que la población descendió a 1000 ejemplares, siendo esta cifra ya una alerta de la situación del lince en España, sin embargo, continuó descendiendo hasta llegar a los 160 ejemplares en el año 2002, y dos años más tarde la situación se hizo crítica, pues la población sufrió una regresión a menos de 100 individuos adultos. En ese momento el lince ibérico fue clasificado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) en “peligro crítico” (aquellas especies que se están enfrentando a un riesgo extremadamente alto de extinción en estado silvestre). El lince ibérico mantuvo esta clasificación de amenaza hasta el año 2015, convirtiéndose así en el felino más amenazado del mundo. Posteriormente, gracias a los esfuerzos de conservación, se revirtió la tendencia decreciente de la población, y la UICN redujo su categoría de amenaza en un nivel y fue clasificado como en “peligro” (aquellas especies que se está enfrentando a un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre), pues había más de 150 individuos adultos en la naturaleza (IUCN, 2015; Rivas *et al.*, 2016; Garrote *et al.*, 2017). Esto se logró gracias a la implementación de diversas medidas de gestión orientadas a estabilizar la población e intentar revertir esta situación en el futuro (Garrote *et al.*, 2011).

En 2003 se creó un programa de cría en cautividad para obtener lince ibéricos aptos para poder ser reintroducidos en su hábitat, y en el año 2010 nacieron menos de 100 individuos (Sarmento *et al.*, 2019). Un año más tarde se liberó el primer ejemplar, lo que representó un éxito del programa de cría en cautividad llevado a cabo. En el año 2015 se censaron un total de 361 lince en Doñana-Aljarafe, Andújar-Cardena, Guadalmellato y Guarrizas. El mismo año también comenzaron a liberar individuos en otras zonas de la península, como Portugal, Castilla-La Mancha y Extremadura (Rivas *et al.*, 2016).

Para buscar una solución al problema se creó una Estrategia de Conservación en la que colaboran entidades regionales, nacionales e internacionales, que integra un Programa de Conservación *Ex-situ*, recogido por el Plan de Acción para la Cría en Cautividad.

Las razones principales que llevaron a la situación en la que se encontraba, y se encuentra, este felino han sido una conjunción de circunstancias. Entre ellas destaca la disminución en un 80% de la población de su principal presa, el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), a consecuencia del virus de la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica del conejo, así como la alteración y destrucción de los ecosistemas que habitan, tanto el conejo como el lince. A estos cambios en la naturaleza se le suma la mortalidad debida a la acción del hombre: la caza furtiva, para la obtención de las pieles de los lince y su posterior comercialización; envenenamientos; y muertes no intencionadas como atropellos.

Un factor importante a tener en cuenta es la baja variabilidad genética debida al bajo número de individuos, lo que ha dado lugar a la aparición o persistencia de efectos negativos en la especie, como la pérdida de respuesta del sistema inmunológico. La consecuencia fue que la especie se considerase de alto riesgo sanitario, expuesta a la propagación de cualquier brote infeccioso que pueda provocar la extinción de la población local. En los últimos años, esto ha dado lugar a la creciente importancia del conocimiento de las enfermedades (por ejemplo, la leucemia felina) (De los Santos Parejo, 2015; IberLince, 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, el lince Ibérico se localiza exclusivamente en la Península Ibérica. Dentro de la misma se localiza en diferentes centros de cría en cautividad para la conservación de la especie, como el Acebuche en Huelva y Granadilla en Cáceres, ambos dirigidos por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente a través del Organismo Autónomo de Parques Nacionales. También se pueden encontrar ejemplares de esta especie en el centro La Olivilla, ubicado en Jaén, y en el centro de Silves situado en Portugal. Estos dos últimos centros están dirigidos por la Junta de Andalucía y el Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas de Portugal respectivamente. Además de los centros de cría, hay definidas seis áreas de reintroducción de Lince Ibérico: Vale do Guadiana (Portugal), Montes de Toledo y Sierra Morena Oriental (Castilla-La Mancha), la cuenca del río Matachel (Extremadura), Guadalquivir y Guadarrama (Andalucía) (Figura 1) (MITECO, 2021a).

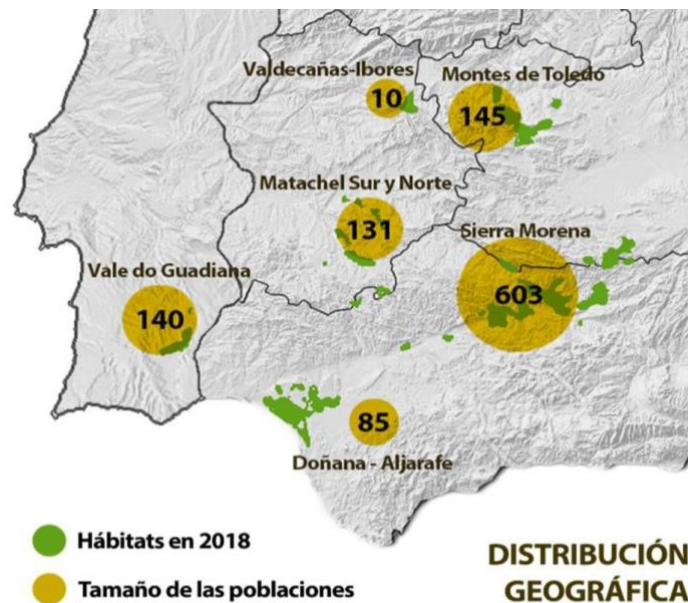


Figura 1. Distribución geográfica del lince Ibérico 2020 (MITECO, 2021b).

Gracias al éxito de los Programas de Cría en Cautividad se estimó que la población de lince Ibérico en España y Portugal en 2020 era de 1111 ejemplares, entre individuos adultos maduros e inmaduros, y cachorros (Tabla 1).

Tabla 1. Censo población del lince Ibérico 2020 (MITECO, 2021b).

ÁMBITO TERRITORIAL	Nº total adultos e inmaduros (nº de hembras reproductoras/territoriales)	Nº de cachorros nacidos en 2020	Total de lince 2020
PORTUGAL	80 (26)	60	140
ESPAÑA	617 (213)	354	971
Andalucía	349 (124)	157	506
Castilla-La Mancha	180 (47)	147	327
Extremadura	91 (42)	50	141
Total	697* (239)	414	1111*

*= 3 ejemplares macho han sido censados simultáneamente en 2020 en Andalucía y Extremadura

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Dada la situación en la que se encuentra el linco ibérico se ha querido realizar una revisión bibliográfica que ayude a entender en mayor profundidad las características reproductivas de estos felinos, y cómo afectan a la elaboración y puesta en marcha de los Programas de Conservación.

Por tanto, los objetivos de este estudio son:

- Mostrar una breve descripción de la anatomía y fisiología reproductiva, profundizando en los caracteres que la hacen de especial interés.
- Describir las técnicas de monitorización reproductiva para el linco ibérico y su aplicación.
- Conocer las opciones que ofrecen los Bancos de Recursos Biológicos para su uso posterior.
- Introducir los objetivos principales del Programa de Cría para la Conservación del Linco Ibérico.

4. METODOLOGÍA

Para la realización de esta revisión bibliográfica se han utilizado diferentes bases de datos como PubMed, Science Direct, AlcorZe. También se han utilizado guías de conservación del Linco Ibérico publicadas en el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, así como páginas de divulgación científica como Lynx Ex Situ, Lincelberico.ue.

Las palabras claves utilizadas para una búsqueda avanzada han sido: *Lynx pardinus*, *persistent corpus luteum*, *biological resource banks*, *PGFM*, etc.

5. RESULTADOS

5.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA FELINA

La anatomía de los felinos domésticos es muy similar a la de los felinos silvestres, como en este caso, el linco (Lamberski, 2015). Es por ello que se ha descrito la anatomía del aparato reproductor del gato.

Respecto a la hembra felina (Figura 2), generalmente los ovarios tienen forma oval y miden aproximadamente entre 0'5 cm y 1 cm. El útero de los felinos se clasifica como útero bicorne y el cuerpo es de pequeño tamaño (2 cm de longitud). Los cuernos uterinos se caracterizan por ser muy largos (12-15 cm). El cérvix se introduce dentro de la vagina, en dirección ventrocaudal y comunica la cavidad uterina con la cavidad vaginal. Se encuentra craneal a la vulva aproximadamente 3,5 cm. El canal cervical se encuentra abierto durante el estro y cerrado en

otras fases del ciclo estral. La vagina tiene una longitud de 2 cm aproximadamente, y se extiende desde el cérvix hasta el himen, que se encuentra craneal al orificio uretral externo, en el vestíbulo. El vestíbulo se abre caudal al himen, rodeado por músculo estriado y cubierto por epitelio estratificado escamoso; en el suelo del mismo se ubica el orificio uretral externo. El clítoris está localizado ventralmente al vestíbulo en la fosa clitorídea.

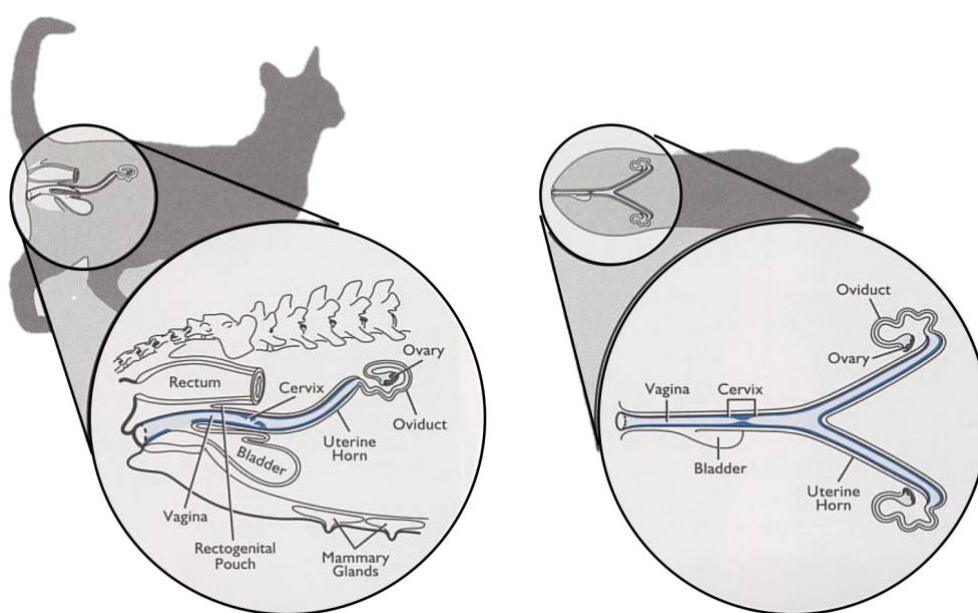


Figura 2. Vista lateral y dorsal del aparato reproductor de la gata (Senger, 2003).

Respecto a la anatomía reproductiva del macho felino, los testículos son de pequeño tamaño, redondeados y se localizan dentro de la bolsa escrotal, en el perineo. El pene está compuesto por un cuerpo esponjoso, que a su vez está formado por la raíz, el cuerpo y el glande, y dos cuerpos cavernosos. El glande es morfológicamente cónico y posee unas espículas córneas (N.º 120 – 150) que lo envuelven (Imagen 1). El epidídimo está formado por tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola. El plexo pampiniforme en conjunto con el escroto y el músculo cremáster regulan la temperatura de los testículos, de él se origina la vena testicular, que irriga los testículos junto con la arteria testicular. Estos vasos junto con el plexo nervioso testicular, los vasos linfáticos y el conducto deferente, que no presenta ampolla, forman el cordón espermático (Brown, 2011; Stornelli y Luzbel de la Sota, 2016).



Imagen 1. Espículas córneas del pene del Lince Ibérico (Gañán *et al.* 2010).

5.2 FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL LINCE

Gracias al estudio inicial de la fisiología de la reproducción del gato doméstico se ha obtenido información muy valiosa sobre la función ovárica en otros felinos (Brown, 2018).

5.2.1 Hembra

Como ocurre en el ciclo de la gata doméstica, si tras el apareamiento no hay gestación o en el caso de que las hembras no estén en contacto con machos, como es el caso de aquellos animales que mantienen en cautiverio, puede darse el caso de que ovule de forma espontánea y se forme un cuerpo lúteo (CL) ocasionando una fase lútea infértil también denominada pseudogestación. El CL es una glándula endocrina transitoria que se forma tras la ovulación y que produce progesterona (P_4), por lo que se encarga de mantener la gestación. En la gata doméstica el día 49 de gestación el CL de gestación involuciona a cuerpo *albicans*, dejando de producir P_4 , mientras que en la gata pseudogestante comienza a involucionar el día 25 del ciclo (Figura 3). En algunos mamíferos si esta involución no se produce se observa un CL persistente, de carácter patológico, pues se relaciona con alteraciones hormonales y problemas de infertilidad, como ocurre en vacas (Hryciuk *et al.*, 2019). Sin embargo, en el caso del lince ibérico, el CL que se forma en los ovarios (al igual que en el lince Euroasiático y Canadiense) se ha visto que persiste tanto estructural como funcionalmente tras el parto y la lactación (Figura 4), pudiendo permanecer activo hasta más de 2 años (Jewgenow *et al.*, 2014, Painer, 2016). Esto condiciona su ciclo, pues se da la presencia continua de progesterona que se libera debido a la formación de estos CL persistentes que aparecen de forma fisiológica junto con los CL del ciclo (Tabla 2), y suprimen la actividad ovárica debido al *feedback* negativo que produce la progesterona en el ciclo. Como consecuencia tienen un único ciclo ovulatorio al año y se clasifican, por tanto, como hembras monoéstricas. A pesar de esto, se ha visto que un segundo estro puede ocurrir en determinadas condiciones poco comunes, como en caso de reabsorción del feto, aborto, etc. (Branco, 2016). Se cree que este mecanismo permitiría evitar ovulaciones tardías, garantizando

así el nacimiento y destete de los cachorros durante la época más favorable del año. La ovulación en esta especie es tanto inducida como espontánea, y el ciclo es de carácter estacional. La época reproductiva comienza en enero-febrero, pudiendo alargarse hasta mayo.

Para determinar si la presencia de estos CL persistentes son la verdadera causa de la supresión de la actividad ovárica y, por lo tanto, de que se trate de hembras monoéstricas, Painer *et al.*, en 2014a, entre otros, llevaron a cabo una serie de estudios. En los mismos se realizaron tanto exámenes histológicos como endocrinos a partir de muestras de ovarios de lince, obtenidos durante necropsias, y ecografías y análisis hormonales en heces y orina. Además, se debe tener en cuenta que todas estas pruebas deben hacerse sobre los mismos animales al menos durante dos ciclos reproductivos para que la evidencia tenga valor. Durante esta investigación también se observó que los lince estudiados no presentaban inactividad ovárica completa (anestro) una vez alcanzaban la madurez sexual, por lo que se considera que el lince presenta un diestro prolongado.

La hembra de lince ibérico puede volver a ciclar a pesar de la presencia continua de progesterona liberada por el CL. Se han realizado estudios sobre el mecanismo que regula la regresión o disminución de actividad del CL, y se han propuesto diversas hipótesis sobre ello, como por ejemplo el estudio realizado por Amelkina *et al.*, en 2015 sobre la implicación del proceso de apoptosis en la persistencia, estructura y funcionamiento de los CL, en el que también se lleva a cabo un estudio histológico de los CL de ciclo y persistentes; o en el estudio realizado también por Amelkina en 2016, en el que se discuten cuáles son los posibles roles de los receptores de esteroides sexuales en la formación, mantenimiento e involución del CL en los felinos domésticos, y su posible participación en el mecanismo de persistencia fisiológica del CL en el lince. En conclusión, a día de hoy todavía se desconoce la causa exacta, y es por ello que se requieren más estudios (Amelkina *et al.*, 2016).

El ciclo del lince Ibérico se ha denominado como “Non-cat-like reproductive cycle”, y este hecho reproductivo característico condiciona el éxito de las técnicas de reproducción asistida que se aplican en los Programas de Cría para la conservación de la especie. Esto se debe a que, si la hembra no queda gestante tras el apareamiento, habría una pérdida de toda una temporada de reproducción, con lo que ello supone la pérdida de lince, desde el punto de vista genético, muy valiosos (Zschockelt, 2016).

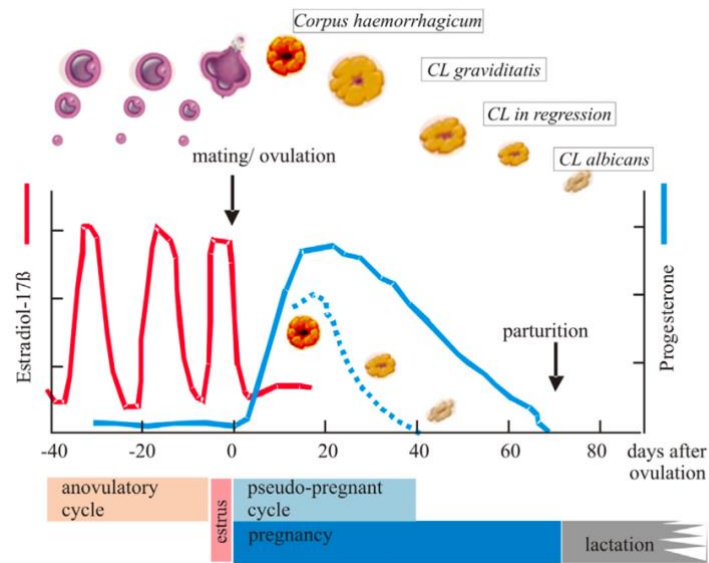


Figura 3. Ciclo reproductivo generalizado del gato doméstico. Perfiles séricos de estradiol y progesterona, así como cambios dinámicos de las estructuras funcionales ováricas (folículos, *corpora hemorrhagica*, *CL graviditatae*, CL en regresión y *corpora albicans*) (Jewgenow *et al.*, 2014).

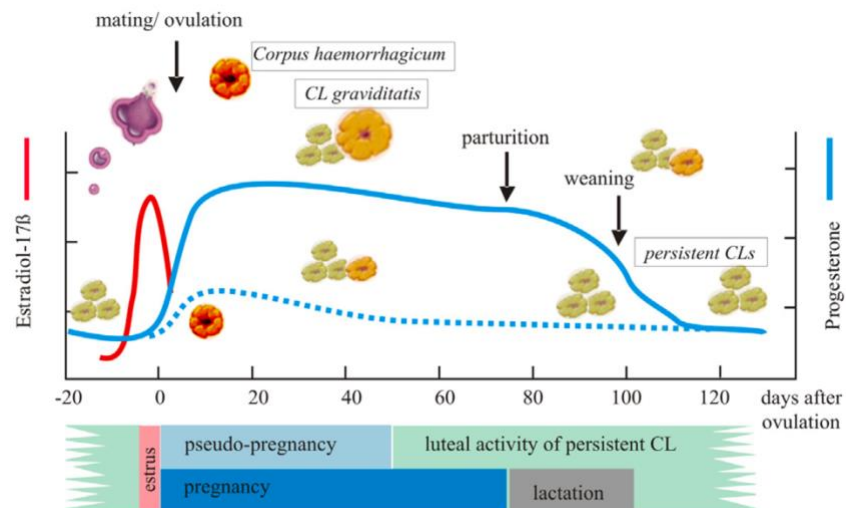












Figura 4. Ciclo reproductivo anual generalizado del linco euroasiático. Perfiles séricos de estradiol y progesterona, así como cambios dinámicos de las estructuras funcionales ováricas (folículos, cuerpos hemorrágicos, *CL graviditatae*, CL persistente) (Jewgenow *et al.*, 2014).

Tabla 2. Esquema comparativo de los CL en fase folicular y fase lútea del lince y otros felinos durante una época reproductiva (Painer, 2016).

	FUERA DE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA	ESTRO	GESTACIÓN/ PSEUDOGESTACIÓN	PARTO/ LACTANCIA	FUERA DE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA
Otros felinos	 No CLs	 Folículos de tamaño visible para la ecografía	 Folículos que han ovulado se convierten en CL	 Los CLs sufren luteólisis	 Los CLs han involucionado
<i>Lynx</i>	 CLs viejos de ciclos reproductivos previos	 CLs viejos más folículos de gran tamaño	 CLs viejos y CLs nuevos	 CLs de diferente edad en un ovario	 CLs de diferente edad en un ovario

5.2.1.1 Estudio histológico de CL de ciclo y CL persistente

En el estudio macroscópico e histológico de ovarios de lince ibérico ovariectomizados tras la monta natural, se observó que los CL de ciclo poseían una cicatriz en la superficie debido a la ovulación, y eran de mayor tamaño y de un color más claro que los CL persistentes. Estos últimos se encontraban en una posición más interna del ovario que los CL frescos. Desde el punto de vista histológico se determinó que los CL del ciclo se encontraban en una etapa de formación pues se observaron células luteinizantes, principalmente de pequeño tamaño, y los CL persistentes se encontraban en una etapa de mantenimiento con células luteinizadas poliédricas y de gran tamaño, sin mostrar rasgos de regresión (Imagen 2).

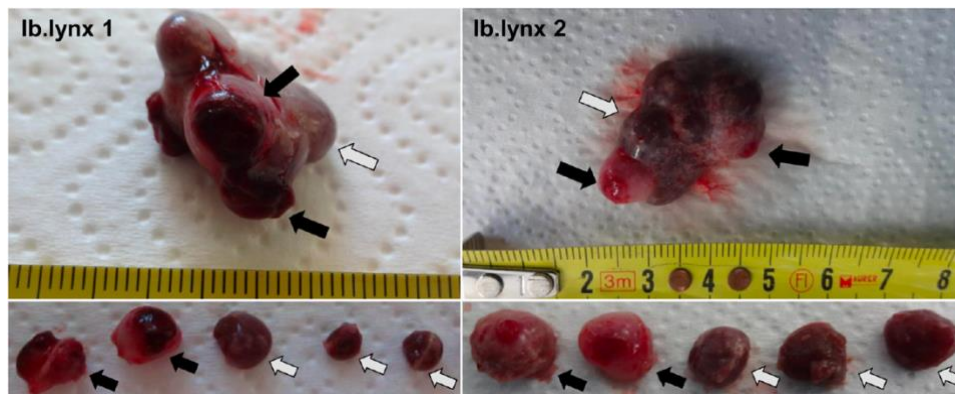


Imagen 2. Ovarios del lince ibérico 1 y 2 (Ib.lynx 1 e Ib.lynx 2, respectivamente), que contienen CL de ciclo y CL persistentes. Las flechas negras indican CL de ciclo con cicatrices de ovulación, las flechas blancas indican CL persistente de ciclos anteriores (Almelkina *et al.*, 2015).

5.2.1.2 Perfil hormonal de la hembra

En el caso de los felinos los perfiles plasmáticos de P_4 producidos por el CL, que se obtienen tanto de hembras gestantes como de pseudogestantes, generalmente no varían hasta pasados 10 - 12 días tras el coito. Es en este periodo cuando ocurre la implantación y, por tanto, cuando comienzan a incrementarse los niveles de P_4 en las hembras gestantes. A partir de este momento, la P_4 aumenta de forma progresiva hasta el día 21 y posteriormente desciende hasta el día 65 (momento del parto). En el caso de las hembras que no se quedan gestantes, la P_4 vuelve a valores basales (1 ng/ml) a los 45 días, aproximadamente. La fuente de P_4 en gatas domésticas es el CL hasta el día 45 de gestación, después involuciona estructuralmente a cuerpo albicans, y la principal fuente de P_4 es la placenta. En el lince, por el contrario, el CL es persistente, como ya se ha comentado, por lo que durante la gestación tiene dos fuentes de P_4 , el CL y la placenta, y los niveles séricos basales que se detectan de P_4 son de 5 ng/ml. Cuando la hembra de lince ovula la concentración de P_4 sérica ascienden a 15 ng/mL o incluso valores superiores. En el caso de que la hembra quede gestante se puede observar una concentración sérica de P_4 de hasta 180 ng/ml, manteniéndose elevada durante el periodo de lactación, pues se han observado valores de 170 ng/ml (Göritz *et al.*, 2009; Jewgneow *et al.*, 2014; Painer *et al.*, 2014a; Painer, 2016).

Los niveles de P_4 intralúteos de los CL presentes en hembras no gestantes (CL persistentes) estuviesen o no en la época reproductiva, no variaron a lo largo del año en el que se llevó a cabo el estudio, sin embargo, en las hembras gestantes (CL de gestación) estos niveles de progesterona estaban más elevados (Carnaby *et al.*, 2012).

Los niveles de estrógenos (E_2) excretados en heces aumentan en la época de reproducción, en el momento preovulatorio (concentraciones séricas de 1.58 ng/ml), y en los últimos 15 días previos al parto. A partir de junio y hasta el nuevo inicio del ciclo ovulatorio, el perfil de E_2 excretado es muy similar entre aquellas hembras gestantes y pseudogestantes, lo que limita el uso de algunas técnicas de detección de la gestación que se mostrarán más adelante (Pelican *et al.*, 2009; Painer *et al.*, 2014a; Zschockelt *et al.*, 2014).

Los niveles de E_2 intralúteos, al igual que con la P_4 intralútea, eran superiores en hembras gestantes (CL de ciclo) frente a hembras no gestantes.

Los niveles de prostaglandinas en heces y orina muestran un paralelismo significativo.

La prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) es una hormona que actúa como señal placentaria de gestación en el lince ibérico. Aunque esta hormona está presente en la mayor parte de los tejidos, las prostaglandinas producidas a nivel de la placenta y el útero tienen una labor muy importante regulando procesos reproductivos como la función y vida útil de los cuerpos lúteos, a su vez relacionado con la gestación, el parto y el inicio de un nuevo ciclo reproductivo.

La $PGF_{2\alpha}$ se metaboliza inicialmente en los pulmones dando lugar a un metabolito sérico, la PGFM, la cual vuelve a metabolizarse a nivel renal y se excreta en orina como en heces. Además, la vida media en sangre del metabolito PGFM es más prolongada que la de $PGF_{2\alpha}$ (Tabla 3) (Finkenwirth *et al.*, 2010; Dehnhard *et al.*, 2012; Dehnhard *et al.*, 2017).

Durante el estudio realizado por Dehnhard *et al* en 2017, cuyo objetivo era determinar cuáles eran los metabolitos principales que aparecían en heces y orina de la $PGF_{2\alpha}$ en el lince euroasiático. Mediante el uso de HPLC se detectó la presencia de otras prostaglandinas diferentes a la $PGF_{2\alpha}$, pues aparecieron una serie de moléculas con una inmunoreactividad similar al metabolito PGFM. Por lo que sospechaban que metabolitos de otras prostaglandinas luteotrópicas se estaban midiendo en la determinación del metabolito PGFM. Se determinó que había niveles elevados de PGE en la segunda mitad de gestación (Figura 5).

Tabla 3. Parámetros reproductivos en diferentes estadios reproductivos (Painer et al., 2014a)

MOMENTO DEL CICLO	N	E2 (ng/ml)	P4 (ng/ml)	PGFM (ng/ml)
Pro-estro	10	0,59±0,34	2,65±2,77	2,59±0,81
Estro	4	1,49±0,04	2,08±0,70	1,23±0,45
Meta-estro	3	0,78±0,86	13,07±8,1	1,46±0,44
Diestro prolongado	26	0,32±0,21	4,68±3,45	1,82±0,91
Gestación	3	0,56±0,14	84,05±83,85	2,61±1,18
Lactancia	2	0,18±0,44	3,14±170,38	4,41±1,48

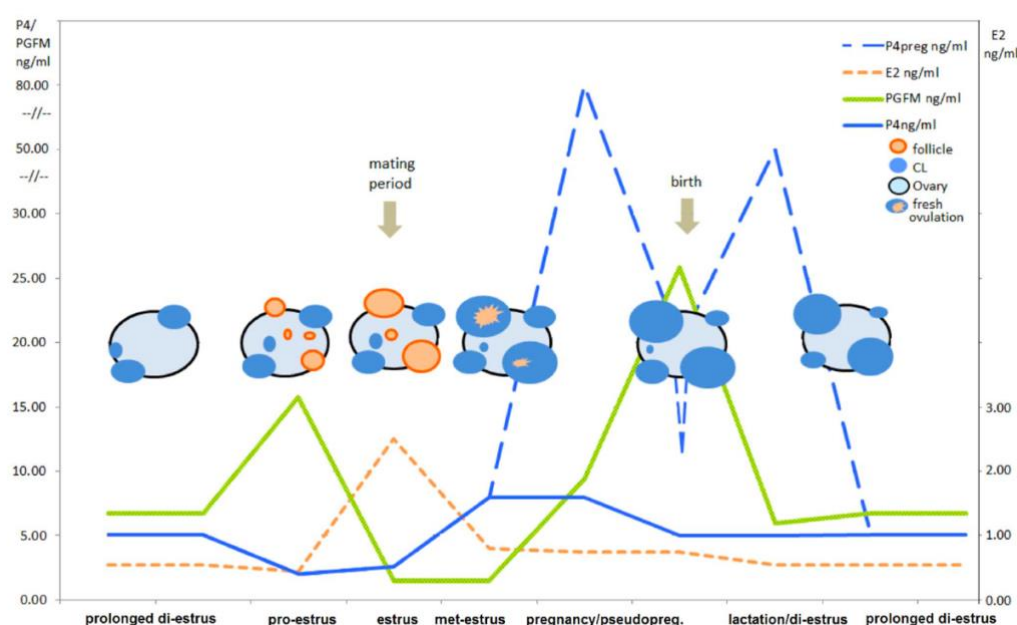


Figura 5. Esquema del ciclo ovárico del lince. Diagrama esquemático del desarrollo de folículos y CL en un año reproductivo en lince gestantes y no gestantes (Painer *et al.*, 2014a).

5.2.1.3 Apareamiento, gestación y parto

Las hembras de lince ibérico no adquieren su potencial reproductor hasta los 3 años, y según un estudio realizado por Pelican *et al.*, en 2005 se observó que pueden criar hasta los 9 años. Sin embargo, los machos no alcanzan su potencial hasta los 4 años, aunque son sexualmente maduros a partir de los 2 años de edad.

Durante el celo los machos persiguen a las hembras entre 48 y 72 horas, y se aparean el mayor número de veces posible (entre 20 y 30 veces), para que haya una mayor probabilidad de que

la hembra se quede gestante, ya que es posible que no vuelva a entrar en celo hasta el siguiente año. Cada cópula suele durar un minuto.

La gestación del lince ibérico dura entre 63 y 67 días, una duración similar a de la gata doméstica, y da lugar a camadas de entre 1 y 3 cachorros.

El parto se produce entre la segunda semana de marzo y la primera de abril, aunque es posible observar nacimientos tardíos (Simón, M. *et al.* 2012).

5.2.2 Macho

La actividad reproductiva de los machos es de particular interés, ya que las hembras únicamente ciclan una vez al año, y la temporada de reproducción es estrecha (alrededor de 1 mes) (Müller *et al.*, 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, los testículos de los machos son de pequeño tamaño en comparación con los de otros felinos, incluso de un tamaño y peso similar, como es el caso del caracal. Algunas de las posibles causas que podrían explicar este fenómeno son la genética, problemas en la alimentación, el entorno (estrés), época reproductiva, etc. Para descartar que se tratase de un problema de malnutrición, estrés o la época del año, se estudiaron tanto animales en cautiverio como en la naturaleza, además de en distintas épocas del año, y no se vieron diferencias significativas. Por otro lado, se conoce que la variabilidad genética de las poblaciones de lince ibérico es baja debido a la situación de peligro en la que se encuentran dado el bajo número de ejemplares.

Según el estudio realizado por Gañán *et al.* en 2010, se observa que el peso de los testículos dentro de los lince ibéricos varía con la edad, pues en los machos más jóvenes del estudio (2 años) los testículos eran menos pesados que aquellos de mayor edad (4 años). En estos últimos los niveles de testosterona y cortisol eran más elevados respecto al grupo de menor edad estudiado (2 años). El volumen de eyaculado y la concentración de espermatozoides era mayor también en machos de mayor edad (4 años), aunque la diferencia no es significativa. La motilidad de los espermatozoides también es más alta en machos más mayores, y es más probable encontrar espermatozoides anormales en aquellos machos que no han alcanzado la madurez sexual (2 años). En este estudio también se midió el pH de las muestras y se determinó que el pH de los adultos es más básico (pH 8.0) que el de los ejemplares más jóvenes del estudio (pH 7.0). Los machos de lince ibérico muestran una proporción muy alta de espermatozoides anormales en comparación con otros felinos, es decir, en esta familia la teratospermia tiene una alta prevalencia, pues aproximadamente el 60% de los espermatozoides del eyaculado son anormales (Tabla 4). La conclusión de su estudio es que no hay diferencias significativas de los

diferentes parámetros estudiados en machos cautivos y en libertad. Sin embargo, sí que se observó una pequeña diferencia en la motilidad de los espermatozoides de las muestras de machos en libertad.

Estos parámetros también varían según el método de recolección y el tiempo que transcurre desde su recogida hasta su análisis (electroejaculación vs. epidídimo de animales muertos).

Tabla 4. Rasgos fenotípicos, testiculares y espermáticos de lince ibérico recuperados *post mortem* (Gañán *et al.*, 2010).

	MACHO				
	FM1	FM2	FM3	FM4	Media±E.S.M
Edad (años)	2	3	4	11	
Peso corporal (kg)	11,00	ND	12,35	8,26	9,2±1,61
Peso total de los testículos (gr)	5,14	5,92	6,11	4,7	5,4±0,28
Peso relativo de los testículos ($\times 10^{-4}$)	4,67	ND	4,95	5,69	5,1±0,31
Número total de espermatozoides ($\times 10^6$)	7,31	31,15	0,55	1,96	10,02±1,78
Motilidad (%)	0	45	0	50	47,5±2,5
Calidad del movimiento (escala 0-5)	0	2	0	2,5	2,2±0,25
Índice de motilidad de los espermática (SMI)	0	42,50	0	50	46,2±3,75
% de espermatozoides viables	48	68,25	23	ND	46,4±13,09
Espermatozoides de morfología normal (%)	38	54	17	18	31,7±5,92
Acrosoma intacto (%)	32	32	44	46	38,5±3,79
% de espermatozoides sin gota citoplasmática	67	94	95	72	82±7,47

Peso relativo de los testículos = peso total de los testículos / peso corporal. Índice de motilidad de los espermatozoides (SMI) = (% de motilidad de los espermatozoides + (20 x calidad de motilidad)) / 2. ND, no determinado. ESM: Error estándar de la media.

5.2.2.1 Perfil hormonal del macho

En el caso del macho se han estudiado los perfiles de testosterona excretada en heces y se ha visto que, durante la época de reproducción (enero-mayo) tiende a aumentar y en verano y otoño estos niveles tienden a descender, aunque se producen picos de metabolitos de testosterona durante todo el año. Por lo que, al producir espermatozoides durante todo el año, podrán dar lugar a descendencia en cualquier época, reproductiva o no (Pelican *et al.*, 2009). Sin embargo, el volumen de eyaculados, los porcentajes de espermatozoides móviles, la

concentración de testosterona fecal y los espermatozoides intactos aumentan durante la temporada de reproducción (Göritz *et al.*, 2009).

5.3 INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL MANEJO DE LA ESPECIE

Las técnicas de monitorización no invasivas presentan una serie de ventajas y desventajas respecto a la monitorización invasiva. Tratando las ventajas, estas técnicas permiten analizar muestras sin contacto con el animal, a diferencia de las tomas de sangre, reduciendo así las variaciones que pueden suponer algunas variantes, como el estrés, en los resultados; permiten un mayor conocimiento de animales silvestres no criados en cautiverio; además de servir como herramienta importante en la cría de animales en cautiverio, así como para la investigación de los efectos ecológicos y sociales de los linces en la naturaleza.

Uno de los principales inconvenientes que surgen con algunas de estas técnicas, como son los análisis hormonales en heces, es que existen una gran cantidad de diferentes metabolitos fecales que incluso pueden encontrarse en otras especies íntimamente relacionadas con el lince, por ello es necesario llevar a cabo una evaluación cuidadosa de los métodos de ensayo que se van a utilizar para obtener resultados precisos y significativos (Schwarzenberger, 2007).

5.3.1 MONITORIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL

5.3.1.1 Evaluación del comportamiento

Esta técnica de detección del estro precisa de un conocimiento amplio del comportamiento propio de la especie, así como del individuo, pues existen diferencias intraespecie y del propio individuo. En el caso de los animales que se encuentran en libertad, la detección por este método no es muy útil, puesto que se necesitan muchas horas de observación y estudio. En el caso de aquellos animales que se encuentran en cautiverio, además de lo anteriormente descrito, están sometidos al estrés de esas condiciones lo que lleva a que los cambios comportamentales propios del animal pueden verse alterados o cohibidos.

En el caso del lince ibérico no hay unos comportamientos reproductivos específicos de la especie como puede observarse en otras especies (lordosis en el gato doméstico), lo que tampoco significa que el estro sea silencioso, sino que hay cambios de frecuencia sutiles en su comportamiento normal del día a día, por ejemplo, se mueven más, se acicalan más, etc. (Andrews *et al.*, 2020).

Debido a la continuidad, horas e intrusismo que requiere una buena evaluación comportamental para detectar esos cambios sutiles en el comportamiento del animal, se ha estudiado el uso de acelerómetros, una herramienta homologada y automatizada que revela la duración e

intensidad del movimiento, dirección en la que lo hace, e incluso detecta comportamientos estáticos. Además, son dispositivos de pequeño tamaño, fáciles de usar, y de poco coste económico. Tal como se muestra en el artículo de Sarmiento *et al.*, de 2019 estos dispositivos los utilizan junto a los collares GPS para la monitorización de los animales, detectando por donde y como se mueve, así detectan por ejemplo si algún ejemplar está muerto (Andrews *et al.*, 2015; Jon, 2015). A día de hoy estas herramientas no se están utilizando para la monitorización del ciclo de la hembra pues, aunque se ha estudiado en gatos, se ha visto que resulta complejo diferenciar entre aquellas hembras que están fase lútea gestante y fase lútea no gestante.

5.3.1.2 Monitorización hormonal de estrógenos y progesterona en heces y/u orina

- **¿Por qué se hace?**

Los metabolitos de moléculas lipofílicas como esteroides y prostaglandinas, una vez han sido metabolizados en el hígado, son excretados en las heces a través de la bilis y en la orina, o pueden seguir un camino diferente y ser reabsorbidos por la circulación enterohepática durante el tránsito intestinal. Es por ello, que la excreción de estos metabolitos son un reflejo de la cantidad de hormonas que hay circulantes en sangre y por tanto nos pueden mostrar cambios endocrinos que se han producido en el cuerpo (Kersey y Dehnhard, 2014). Como consecuencia se observan perfiles hormonales correlativos al mismo tiempo en plasma y en heces, apareciendo así una actividad endocrina en heces representativa de diferentes tiempos. La ruta de excreción de los metabolitos no solo varía según la especie que se estudia, sino también según los esteroides que se analizan, pues se ha observado que la presencia de estos metabolitos en heces difiere según haya sido el proceso de metabolización, pues mientras que los derivados de estrógenos (estradiol, estrona) son fácilmente medibles/detectables en heces, otras hormonas como la testosterona, progesterona, cortisol/corticosterona son difíciles de medir debido a su intenso proceso de metabolización.

- **Recolección de muestras a analizar:**

La recolección de orina para su posterior análisis se puede obtener tanto de lince en su medio natural como lince en cautividad. En el caso de aquellos que se encuentran en cautividad se utiliza un recolector. Este dispositivo debe colocarse en aquellas localizaciones en las que los lince tienden a marcar, para asegurarse así de que se va a recolectar la muestra. Consta de una placa de acero inoxidable en la que contacta la orina y la conduce hasta un embudo que tiene en la parte de abajo, y que conecta con un recipiente de vidrio. Tras la recolección, la orina se congela a -20°C inmediatamente, y posteriormente se congela a -80°C hasta su análisis químico. También se pueden aprovechar aquellos momentos en los que los animales se sedan para otros

procedimientos, y se presiona la vejiga para obtener una muestra. Por otro lado, las heces una vez han sido recolectadas se deberán almacenar a -20°C hasta su análisis. La recolección de orina de animales que se encuentran en libertad es más compleja. En un estudio sobre la composición de la orina del lince Euroasiático se describió que se recolectaban aquellas áreas de nieve con orina congelada. El método de conservación es el mismo que en el caso de la orina recolectada de individuos en cautividad (Vogt *et al.*, 2016; Dehnhard *et al.*, 2017).

5.3.1.3 Citología vaginal

La citología vaginal es una técnica a partir de la cual se puede controlar el ciclo reproductivo de los felinos mediante el análisis citológico de las muestras (Andrews *et al.*, 2020).

En el estudio realizado por Painer *et al.*, en 2014a se tomaron muestras mediante hisopados vaginales en los diferentes estadios reproductivos en un total de 20 hembras (10 hembras en cautividad y 10 hembras en libertad). En la fase de proestro se observaron células basales e intermedias basófilas de forma redondeada y ovalada, y cuando los niveles de estrógenos ya estaban más elevados se observaron también células superficiales basófilas o acidófilas de mayor tamaño. En el estro se vieron células superficiales acidófilas, con y sin núcleo, de gran tamaño parcialmente cornificadas y plegadas. El metaestro se caracterizó por la presencia de células superficiales acidófilas sin núcleo. En el periodo de gestación se observaron células superficiales acidófilas y células intermedias. La citología vaginal en la fase de diestro prolongado fue variable, pues se observaron células basales basófilas, células parabasales o células intermedias.

5.3.2 MONITORIZACIÓN DE LA GESTACIÓN

5.3.2.1 Monitorización de PGFM en heces y orina

A diferencia de otros felinos, los niveles de progesterona en el lince ibérico se mantienen elevados incluso fuera de la época reproductiva por la presencia del CL persistente, tanto en hembras gestantes como pseudogestantes. Por otro lado, las concentraciones de estrógenos se elevan en la temporada de reproducción, independientemente de si el animal se aparea o queda gestante (Brown, 2018). Es por ello que el uso de técnicas de diagnóstico de gestación por monitorización de la P4 no resulta útil en el caso de algunas especies, como esta. Gracias al estudio realizado por Finkenwirth *et al.*, en 2010 y Dehnhard *et al.*, en 2012 se desarrolló una nueva técnica para el diagnóstico de gestación que permite diferenciar entre hembras gestantes y pseudogestantes, mediante la medición de las prostaglandinas descritas en el apartado de perfil hormonal de la hembra. Esta técnica suele llevarse a cabo con heces ya que es posible observar un aumento por encima de los niveles de referencia antes que en la orina, en el día 35

del embarazo. La concentración de la PGFM en orina comienza a aumentar aproximadamente el día 30 de gestación, y alcanza su máximo el día 61, después los niveles de PGFM culminan el día 65. En cambio, en hembras pseudogestantes, a partir del día 43 la concentración de PGFM comienza a descender hasta niveles basales. Por tanto, esta técnica no invasiva resulta útil para la detección de gestación en el último tercio de gestación.

Los niveles basales de PGFM en heces oscilan en 0,04 $\mu\text{gr/gr}$ de heces, mientras que el máximo se ha observado que alcanza los 3,73 $\mu\text{gr/gr}$ de heces (Dehnhard *et al.*, 2017).

5.3.2.2 Monitorización de relaxina en orina

La relaxina es una hormona que actúa como señal propia de gestación. En el caso de los felinos, y gracias a diferentes estudios, se observó que esta hormona estaba producida principalmente por la placenta, ya que no se detectó ni en hembras pseudogestantes ni en aquellas que no estaban gestantes.

La relaxina aumenta su producción alrededor del día 20-25 de gestación, es decir, en el segundo trimestre. Posteriormente se produce un pico entre el día 30-50 de gestación, y comienza a descender 10-15 días antes del parto. Esta hormona se excreta a través de la orina y ha sido estudiada como indicador fiable de la gestación en el caso del lince ibérico, entre otras especies, en su etapa de mayor producción. Los días indicados para la toma de muestra y detección de relaxina, como indicador de gestación, en la orina del lince ibérico están entre los 37 y 46 días tras el apareamiento. Si el resultado es positivo se interpreta como hembra en gestación, mientras que si el resultado es negativo no se puede descartar que la hembra está gestante. (Braun *et al.*, 2009; Braun, B. C., Vargas, A. y Jewgenow, K., 2012; Kersey y Dehnhard, 2014).

5.3.2.3 Ecografía abdominal

La ecografía abdominal permite conocer la actividad ovárica, si ha involucionado el CL y si la hembra está gestante. Según la fase del ciclo en la que se encuentren se observan estructuras diferentes. En la fase de estro se observan folículos como estructuras anecoicas esféricas junto con CL que se observa como una estructura irregular hipoeicoica o anecoica en el centro, con espacios oscuros y homogéneos fluidos (Silva *et al.*, 2017). Durante el metaestro se pueden observar cicatrices de ovulación. En la gestación los CL son del mismo tamaño que los de aquellas hembras que son pseudogestantes, sin embargo, durante la lactación los CL de hembras gestantes son más hipereicoicos. Tras el destete los CL de hembra gestante y pseudogestante se observan ecográficamente similares. Los CL de ciclo difieren de aquellos CL persistentes porque son de mayor tamaño e hipereicoicos (Imagen 3) (Painer *et al.*, 2014a).

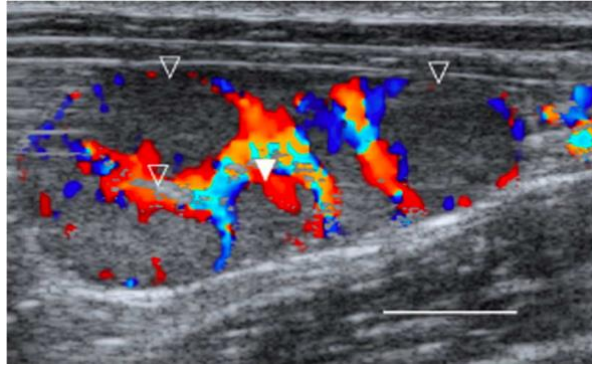


Imagen 3. CL persistente de lince en ecografía. En fase de diestro prolongado en lince fuera de la temporada de reproducción en diciembre. El triángulo vacío apunta a los CL del ciclo ovárico de este año. El triángulo completo señala un CL antiguo, de al menos dos años (Painer *et al.*, 2014a).

El desarrollo de nuevos modelos de ecografía, como es la ecografía tridimensional (3D), aportó nuevos conocimientos sobre el proceso de sucesos tanto fisiológicos como patológicos. La ecografía 3D, en el estudio de Painer en 2016 sobre la ecografía de alta resolución en felinos salvajes, permitió mapear topográficamente los ovarios a través de mediciones repetidas, con el objetivo de evidenciar la consistencia en la estructura y morfología del CL.

Como conclusión se debe remarcar que se requiere un uso combinado de varias de estas técnicas para una mejor detección del estro y gestación (Tabla 5).

Tabla 5. Tabla resumen de las diferentes técnicas no invasivas para monitorización del lince y los aspectos a destacar de cada una de ellas.

	TÉCNICAS NO INVASIVAS	ASPECTOS A DESTACAR DE SU USO PARA LA MONITORIZACIÓN DEL CICLO Y LA GESTACIÓN
MONITORIZACIÓN DEL CICLO	Evaluación del comportamiento	No muy significativo, es muy variable entre individuos No útil en animales en libertad La especie no presenta un comportamiento estral característico
	Monitorización de estrógenos y progesterona	Uso limitado para por la presencia continua del CL persistente
	Citología vaginal	Uso limitado debido a la necesidad de anestesiarse al animal (pudiendo provocar abortos) El diagnóstico en tiempo real es limitado
MONITORIZACIÓN DE LA GESTACIÓN	Monitorización de PGFM en heces y orina	Permite diferenciar hembras gestantes de pseudogestantes
	Monitorización de relaxina en orina	Indicador fiable de gestación a partir de muestras de orina Resultados negativos no descartan posibles gestaciones
	Ecografía normal + 3D	Uso limitado debido a la necesidad de anestesiarse al animal (pudiendo provocar abortos) El diagnóstico en tiempo real es limitado (3D), requiere de protocolos estandarizados para evitar diferencias significativas

5.4 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) comprende diferentes posibilidades:

- Tratamientos hormonales para acondicionar el útero y los ovarios para el inicio del estro y la gestación.
- Recolección de gametos y criopreservación.
- Inseminación artificial
- Fecundación *in vitro*

5.4.1 TRATAMIENTOS HORMONALES

La hembra de lince ibérico sólo cicla una vez al año debido a la presencia continua de P₄ por la existencia de los CL persistentes. Este hecho tiene la consecuencia de que, si se produce un fallo reproductivo, hay una pérdida completa de la época reproductiva.

Painer *et al.*, en 2014b investigaron un tratamiento farmacológico luteolítico para evitar este hecho provocando una luteólisis artificial (pues se produce la involución del CL persistente y, por tanto, aparece de un segundo estro). Observaron que la administración de Cloprostenol (análogo de PGF_{2α}) cada 16 horas durante 3 y 5 días a una dosis de 2,5 mg/kg de peso corporal ocasionaba un efecto similar a la regresión lútea fisiológica y funcional del CL, pero de forma temporal. Es decir, al aplicar el tratamiento se produjo una disminución de la P₄ y de la vascularización ovárica e intraovárica del CL, y el tamaño y el número de CL no variaron significativamente. Posteriormente al tratamiento el nivel de P₄ volvió a los niveles basales (característicos del lince), la vascularización ovárica e intraovárica volvieron a su volumen y fuerza normal. También observó que si combinaba este fármaco durante 5 días con Aglepristone (antigestágeno) o Cabergolina (agonista de la dopamina, inhibidor de prolactina) se producía un efecto similar al anteriormente descrito.

A pesar de obtener estos resultados, no se pudieron sacar conclusiones pues el tamaño muestral era muy pequeño y, además, ninguno de los tratamientos inducía la regresión estructural de los CL ni la aparición del estro. Es por ello que tras este tratamiento deberían de investigar y comparar el éxito de la inducción del estro con o sin la luteólisis artificial anterior (Painer, 2016).

5.4.2 RECOLECCIÓN DE GAMETOS Y CRIOPRESERVACIÓN

En la mayor parte de las especies domésticas se utilizan con éxito técnicas de preservación de gametos, sobre todo de espermatozoides, puesto que son varias las ventajas que derivan de su uso, como por ejemplo la eliminación del riesgo sanitario que supone la introducción de ejemplares de poblaciones diferentes para realizar cubriciones, puesto que se utiliza únicamente su muestra seminal haciendo uso de la inseminación artificial. Este hecho aplicado a especies salvajes podría suponer una mejora en el manejo reproductivo.

A su vez, el uso de estas técnicas reduce los costes económicos, pues supone un menor coste movilizar material biológico que animales, y por otro lado reduciría el estrés que conlleva el traslado de los animales, del cual se podría prescindir.

En el caso del lince, dada la dificultad para la obtención de muestras seminales para establecer un correcto protocolo de preservación seminal, se están aplicando los protocolos habituales de preservación seminal en la especie felina, en el gato doméstico (Johnson, 2018). A pesar de que no hay demasiados estudios sobre congelación seminal, podemos ver que uno de los diluyentes más utilizados para tal fin es el TEST (TES-Tris-egg yolk) formulado con TES, TRIS lactosa y un 20% de yema de huevo (Luvoni, 2006), y Biladyl (Tris-egg yolk) formulado con TRIS con y un 20% de yema de huevo (Gañán *et al.*, 2009). En cuanto al uso de crioprotectores, el glicerol se usa habitualmente y parece que hacerlo en una concentración del 4% podría dar buenos resultados

(Villaverde *et al.*, 2013). El protocolo de congelación que se utilizaría sería el tradicional protocolo en dos pasos, es decir, los espermatozoides permanecen durante un tiempo en un diluyente sin crioprotector equilibrándose y adaptándose al descenso térmico, para pasar después a un segundo diluyente que sí incorpora crioprotector y permite el descenso hasta los -196°C (Buranaamnuay, 2015).

Por otro lado, tendríamos la criopreservación de ovocitos. Para tal fin se siguen también las pautas establecidas en los protocolos de preservación de ovocitos de gata doméstica, y se tendrían que tener las mismas consideraciones. En el caso de la gata, el tiempo de transporte de los ovarios desde su obtención hasta su procesamiento es muy importante, pues puede afectar a la viabilidad de los ovocitos. Colombo *et al.*, 2020 realizaron un ensayo en el que valoraban si el tiempo de transporte tenía repercusión sobre la preservación de los ovocitos mediante vitrificación. Valoraron un transporte en refrigeración (4-6°C) durante 24 horas frente a su procesamiento inmediatamente tras la ovariectomía. Los resultados mostraron que la vitrificación después del transporte era viable y permitía el desarrollo del embrión, la tasa de escisión de ovocitos maduros y la recolección de los mismos fue mayor cuando estos se vitrificaron inmediatamente tras su obtención. Este hecho habría que tenerlo en consideración de cara al trabajo con ovocitos de lince.

Respecto a los protocolos de congelación ovocitaria, en la especie felina la tendencia actual es optar por la vitrificación frente a la tradicional congelación lenta, puesto que ofrece mejores resultados de supervivencia tras la criopreservación. La vitrificación conlleva el uso de concentraciones muy elevadas de crioprotectores. Y al igual que ocurre con los espermatozoides, los medios y protocolos para la preservación de ovocitos de gata doméstica no están totalmente definidos. Por ejemplo, uno de los protocolos de ensayo que se han llevado a cabo con ovocitos de gata es el utilizado por Fernandez-Gonzalez y Jewgenow, 2017, quienes vitrificaron utilizando soluciones que contienen dimetilsulfóxido (DMSO) al 7,5% y etilenglicol (EG) al 7,5%, todo ello sobre un medio base de PBS de Dulbecco (DPBS) o en Medio 199 con un 20% de suero fetal bovino (FBS) durante un tiempo determinado.

5.4.3 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Algunas de las técnicas de reproducción asistida estudiadas en felinos salvajes son la inseminación artificial y la fecundación *in vitro*, entre otras.

En el caso de la IA, antes de llevarla a cabo, se debe aplicar un protocolo de estimulación ovárica, y según el estudio de diferentes protocolos en 9 especies felinas, aquellos que producen un

efecto similar al ciclo natural son los más adecuados. En cuanto al semen, se puede utilizar semen fresco o semen congelado.

El éxito de esta técnica está condicionado por varios factores: la respuesta ovárica a la estimulación, la calidad de los espermatozoides, el momento de la inseminación y el lugar del aparato reproductor de la hembra en el que se deposita el semen.

Las hembras del lince ibérico pueden tener ovulación espontánea, además de CL persistentes que secretan de forma continua P₄, lo que podría interferir con la efectividad de los protocolos aplicados para provocar la estimulación ovárica, dando lugar a fallos en la fertilización, desarrollo embrionario y alteraciones endocrinas.

Según el lugar en el que se deposite el semen se distinguen tres técnicas de IA: intravaginal, intrauterino e intratubárica. La IA intravaginal con semen fresco con un número elevado de espermatozoides (80×10^6) se ha visto que da buenos resultados de fertilización en felinos. El uso de semen congelado en la IA intrauterina e IA intratubárica, y semen descongelado para la IA intrauterina con un número más bajo de espermatozoides ($6,2-8 \times 10^6$ y 4×10^6 respectivamente) también se ha visto que da buenos resultados. A la hora de aplicar o escoger que técnica es más adecuada se debe tener en cuenta que, el lince, entre otros felinos, tiene una gran cantidad de espermatozoides anormales, y para alguna de estas técnicas como es la IA intrauterina debe haber un gran número de espermatozoides motiles en el semen para llegar a los oviductos (Thongphakdee *et al.*, 2020).

5.4.4 FECUNDACIÓN *IN VITRO*

La fecundación *in vitro* es una de las técnicas de reproducción asistida que se han estudiado para aplicar en el lince ibérico. Gañán *et al.* en 2009 desarrollaron una investigación sobre la fertilización *in vitro* con semen de lince ibérico y ovocitos de gata doméstica para valorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides. El semen fue obtenido por electroeyaculación y posteriormente fue criopreservado siguiendo los dos protocolos anteriormente mencionados. El ensayo se llevó a cabo con ovocitos de gata ya que permiten igualmente valorar la funcionalidad de los espermatozoides, además de ser más accesibles. Los resultados obtenidos demostraron que, aunque los espermatozoides diluidos en TRIS dieron mejores resultados que los diluidos en Biladyl, ambos fueron capaces de fertilizar los ovocitos.

5.5. BANCO DE RECURSOS GENÉTICOS DEL LINCE IBÉRICO

La preservación de gametos podemos englobarla dentro de los Bancos de Recursos Genéticos o Biológicos (BRG/BRB), que surgen como un proyecto para la conservación de muestras de todo

tipo de especies, para la realización de estudios epidemiológicos, toxicológicos, programas de conservación para especies amenazadas, etc.

Se trata de almacenes de diferentes tipos de material biológico recolectados, como pueden ser: gametos, embriones (germoplasma), células y tejidos somáticos para la obtención de descendencia; heces y orina para llevar a cabo estudios para conocer el ciclo de la hembra, por ejemplo. Estas muestras se procesan y posteriormente se preservan para su uso en un futuro. Estos bancos actúan como herramienta adicional al mantenimiento del hábitat natural y los programas de conservación *in situ*, pues de lo que se trata es, no solo mantener o aumentar la diversidad genética de la especie tratando de reducir la consanguinidad, sino también de incrementar el número de individuos ya que podrían aplicarse técnicas de reproducción asistida, como inseminación artificial, fecundación *in vitro* y transferencia de embriones. En el caso de especies silvestres el proceso es más complejo debido a la dificultad que supone la toma de algunas muestras y su posterior procesamiento por falta de estudios.

Un ejemplo sería el estudio llevado a cabo por León-Quinto *et al.*, en 2009 para la toma y posterior conservación de muestras del lince Ibérico, que se realizó gracias a un convenio con la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Las muestras que se tomaron fueron piel, músculo, mucosa oral, médula ósea, médula espinal, intestinos y gónadas de lince muertos, y biopsias de piel y sangre completa de lince vivos. Además de orina, pelos arrancados y heces, tanto de cadáveres como de animales vivos. Gracias a este estudio y el estudio realizado por Crespo *et al.*, en 2007, entre otros, se muestra la importancia de realizar un transporte rápido al laboratorio de las muestras, principalmente aquellas que se obtienen de necropsias, pues al tiempo de transporte se le debe sumar el tiempo que se tarda en localizar el cadáver, tiempo en el que aumenta la contaminación de las muestras y que afecta de forma negativa al posible éxito del crecimiento celular.

Independientemente del tiempo de transporte, este debe de hacerse bajo ciertas condiciones para que las muestras no se vean afectadas, o lo hagan lo menos posible. En el caso de las muestras de tejido y células somáticas, una vez han sido recolectadas, son transportadas en una solución de tampón fosfato, y se mantienen a una temperatura de 4°C, evitando así la deshidratación y preservando la viabilidad del tejido. Una vez las muestras llegan al laboratorio se lavan en un medio de cultivo al que se agregan antibióticos, tampones y fuentes de proteínas. Posteriormente estas muestras se fragmentan en diferentes tamaños viables para poder criopreservarse y usarse para el establecimiento de sistemas de cultivo *in vitro*.

Al igual que en el caso de los gametos, las células somáticas pueden ser criopreservadas mediante congelación lenta o mediante vitrificación. Según la revisión bibliográfica realizada por

A. Praxedes *et al.*, en 2018, la técnica de uso habitual en felinos salvajes para la criopreservación de tejido y células somáticas es la congelación lenta. Esta técnica permite usar concentraciones bajas de crioprotectores y se va reduciendo gradualmente y de forma controlada la temperatura. Para determinar qué condiciones de cultivo y soluciones de congelación proporcionan unas propiedades semejantes a las de los cultivos frescos más óptimos, con altas tasas de supervivencia y funcionalidad celular, se han estudiado diferentes combinaciones. Los resultados obtenidos en el estudio de León-Quinto *et al.*, en 2011 concluyeron que la combinación más adecuada era 10% del crioprotector penetrante dimetilsulfóxido (DMSO) solo o combinado con sacarosa 0,2 M, un crioprotector no penetrante.

5.6. PROGRAMA DE CRÍA PARA LA CONSERVACIÓN DEL LINCE IBÉRICO

Los diferentes objetivos y acciones para la conservación de la especie están recogidos en el documento redactado por Vargas *et al.*, 2007. En él se exponen los objetivos principales de su aplicación, como son: instaurar una población *ex-situ* de lince ibérico que sea factible a nivel genético, demográfico y sanitario, a partir de la cual se puedan desarrollar y mejorar, tanto técnicas de reproducción asistida como natural. Y una vez se obtenga esta población, el siguiente objetivo será poder obtener una serie de individuos preparados a nivel reproductivo, etológico, sanitario y genético para ser reintroducidos. Para alcanzar estos objetivos es necesario alcanzar primero otra serie de objetivos más generales, así como específicos de cada disciplina que se ha mencionado.

Los objetivos generales son:

1. Mantener un 85% de la variabilidad genética de la especie durante 30 años (por debajo de esta variabilidad escogida se daría una situación de endogamia). Para ello se estableció que se deberían introducir a este programa 4 cachorros al año en un periodo de 5 años, además de introducir un ejemplar, de viabilidad inferior al resto o herido, cada dos años. Así mismo, se deberá mantener un núcleo de 60 ejemplares reproductores para conseguir mantener la variabilidad genética establecida.
2. Conseguir ejemplares preparados a nivel sanitario, etológico, reproductor y genético para ser reintroducidos, ya sea para crear nuevas poblaciones o para reforzar las ya existentes (Tabla 6).
3. Unificar la gestión del Programa de Conservación *Ex-situ*. Se estableció que habría dos tipos de centros de cría. Por un lado, centros de cría exclusivos, tanto para la cría del lince como para su preparación para la reintroducción, y por otro lado centros de cría asociados, como zoológicos, centros de recuperación de fauna, etc.

4. Unificar la coordinación de los centros de cría bajo la dirección científico-técnica del Programa de Conservación Ex situ.

Los objetivos específicos desde el punto de vista de manejo de la especie son la unificación de los criterios que usan para el manejo del lince que están en el programa, e investigar peculiaridades del manejo de la especie para desarrollar técnicas de manejo adaptadas y que favorezcan el comportamiento natural de la especie en los lince que se encuentran en cautividad.

Desde el punto de vista genético y demográfico son el mantenimiento y aumento de la diversidad genética del lince en cautividad, así como conocer la variabilidad genética de los núcleos poblacionales, ya sea evitando o minimizando pérdidas de eficacia y diversidad genética en la población, siguiendo una estrategia común de manejo genético e incrementando la representación genética de la especie.

Desde el punto de vista de la fisiología de la reproducción son la investigación y desarrollo de nuevas técnicas de cría, ya sea de forma natural o mediante el uso de técnicas de reproducción asistida, y la investigación, desarrollo y uso de técnicas no invasivas para la monitorización del ciclo y de la gestación del lince. Es importante tener en cuenta que la reproducción a veces falla, y a veces las parejas reproductoras no se reproducen, ya sea por infertilidad del macho, en hembras primíparas, por abortos tardíos o por partos prematuros (Painer *et al.*, 2014a).

Desde el punto de vista sanitario es necesario que los lince en cautividad mantengan un estado de salud óptimo para evitar que se propaguen enfermedades de poblaciones cautivas a silvestres, y viceversa. También se deben estudiar y conocer cómo, aquellos riesgos derivados de las diferentes patologías que pueden sufrir o alteraciones fisiológicas, afectan al programa.

Los objetivos que se establecen para la reintroducción de los animales es que se colabore con la conservación *in situ* para crear poblaciones viables y, además, evaluar la eficacia de los programas de reintroducción. Por otro lado, se deben desarrollar nuevas técnicas que permitan criar lince en cautividad y que sean aptos para ser reintroducidos.

Este Programa de Conservación *ex-situ* puede ser útil para concienciar y fomentar los esfuerzos de conservación *in situ* a los diferentes sectores de la sociedad sobre la situación crítica de esta especie.

Tabla 6. Representación numérica de individuos fundadores que han sido capturados, ejemplares que han sido liberados y sueltas acumulativas del año 2014 a 2019 (de Paula Villaespesa, 2018).

AÑO	N	CAPTURA EJEMPLARES FUNDADORES	LIBERACIÓN DE EJEMPLARES	SUELTAS CUMULATIVAS
2011	72	1	12	20
2012	73		12	32
2013	72	1	12	44
2014	73		12	56
2015	72	1	12	68
2016	73		12	80
2017	72	1	12	92
2018	73		12	104
2019	72	1	12	116

En el programa de conservación *ex-situ*, cada año se instauran un número determinado de parejas reproductoras en función de la tasa de reposición que necesite el programa de cría, y la necesidad de introducir ejemplares en las distintas zonas de reintroducción. Se tendrá en cuenta que más del 80% de los cachorros nacidos de estas parejas irán destinados a este último propósito.

Para la temporada de 2021 se han establecido 28 parejas reproductoras, y se espera que nazcan entre 52 y 60 cachorros, de los cuales se estima que entre 39 y 50 ejemplares sobreviven después de los dos meses de vida (Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico, 2021).

6. CONCLUSIONES

Tras la realización de esta revisión bibliográfica se concluye que:

- Puesto que el lince ibérico es una especie clasificada “en peligro”, los tamaños muestrales son reducidos, lo que dificulta la obtención de información sobre su anatomía y su fisiología reproductiva.
- Los artículos publicados sobre técnicas de monitorización no invasiva dirigidas a felinos en general han aportado información específica y validada de estas técnicas en el lince, sin embargo, algunas de ellas aún se encuentran en estudio.
- Los Bancos de Recursos Biológicos posibilitan la preservación de gametos y células somáticas para su posterior utilización, aunque los protocolos todavía están en estudio.
- Los objetivos establecidos en los Programas de Cría son de ámbito público y por ello se ha podido hacer una revisión completa de cada uno de ellos.

CONCLUSIONS

Following this bibliographic review, it is concluded that:

- Since the Iberian lynx is a species classified as “endangered”, number of individuals is reduced, which makes difficult to obtain information about the reproductive anatomy and physiology.
- The articles published regarding non-invasive monitoring techniques for feline in general have provided specific and valid information regarding the lynx, although some of them are still being studied.
- The Biobanks make possible gametes and somatic cells preservation for their posterior use, once again, protocols are being studied.
- The goals established in the Breeding Programs are publics, and therefore it has been possible to make a full revision of every single one of them.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de esta revisión bibliográfica me ha mostrado la importancia que tiene conocer cómo es la reproducción del lince, a nivel fisiológico, entre otros aspectos, para la creación y puesta en marcha de programas de cría para la conservación del lince ibérico.

Una de las principales incertidumbres de la fisiología de la reproducción del lince es cómo desaparecen los cuerpos lúteos. Aunque se han ido encaminando los estudios para determinar cómo es este mecanismo, a día de hoy siguen sin conocerse con exactitud, por lo que, en mi opinión y la de muchos autores, seguir investigando es crucial para seguir desarrollando técnicas de monitorización y reproducción más efectivas, con el fin de aumentar el número de ejemplares.

Llevar a cabo esta revisión bibliográfica me ha permitido mejorar mis capacidades, tanto de búsqueda como de síntesis y contrastación de información científica. Finalmente, destacaría que la mayoría de los artículos que se han usado estaban en inglés, lo que también me ha permitido ampliar mi vocabulario científico.

8. BIBLIOGRAFÍA

Amelkina, O., Zschockelt, L., Painer, J., Serra, R., Villaespesa, F., Braun, B. C. y Jewgenow, K. (2015). "Apoptosis - Related Factors in the Luteal Phase of the Domestic Cat and Their Involvement in the Persistence of Corpora Lutea in Lynx". *PLoS ONE*, 10(11), pp. 1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0143414

Amelkina, O., Zschockelt, L., Painer, J., Serra, R., Villaespesa, F., Krause, E., Jewgenowa, K. y Braun, B. C. (2016). "Progesterone, estrogen, and androgen receptors in the corpus luteum of the domestic cat, Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and Eurasian lynx (*Lynx lynx*)". *Theriogenology*, 86(9), pp. 2107–2118. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.026

Andrews, C. J., Potter, M. A. y Thomas, D. G. (2015). "Quantification of activity in domestic cats (*Felis catus*)". *Applied Animal Behaviour Science*, 173, pp. 17-21. DOI: 10.1016/j.applanim.2015.05.006

Andrews, C. J., Thomas, D. G., Welch, M. V., Yapura, J. y Potter, M. A. (2020). "Monitoring ovarian function and detecting pregnancy in felids: Review". *Theriogenology*, 157, pp. 245-253. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.06.036

Borges da Silva Branco, A. (2016). "Comparação do comportamento na época reprodutiva das fêmeas de lince ibérico em cativeiro". Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Lisboa.

Braun, B. C., Frank, A., Dehnhard, M., Voigt, C. C., Vargas, A., Göritz, F. y Jewgenow, K. (2009). "Pregnancy diagnosis in urine of Iberian lynx (*Lynx pardinus*)". *Theriogenology*, 71(5), pp. 754-761. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.054

Braun, B. C., Vargas, A. y Jewgenow, K. (2012). "The molecular detection of relaxin and its receptor RXFP1 in reproductive tissue of *Felis catus* and *Lynx pardinus* during pregnancy". *Reproduction*, 143(3), pp. 399–410. DOI: 10.1530/REP-11-0316

Brown, J. L. (2011). "Female reproductive cycles of wild female felids". *Animal Reproduction Science*, 124 (3-4), pp. 155-162. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.024

Brown, J. L. (2018). "Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals". *Theriogenology*, 109, pp. 2 – 13. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.004

Buranaamnuay K. (2015). "Determination of appropriate cryopreservation protocols for epididymal cat spermatozoa". *Reproduction in Domestic Animals*, 50(3), pp. 378–385. DOI: 10.1111/rda.12496

Carnaby, K., Painer, J., Söderberg, A., Gavier-Widèn, D., Göritz, F., Dehnhard, M. y Jewgenow, K. (2012). "Histological and endocrine characterisation of the annual luteal activity in Eurasian lynx (*Lynx lynx*)". *Society for Reproduction and Fertility*, 144(4), pp. 478 – 484. DOI: 10.1530/REP-12-0166

Colombo, M., Zahmel, J., Binder, C., Herbel, J., Luvoni, G. C. y Jewgenow, K. (2020). "Ovary cold storage and shipment affect oocyte yield and cleavage rate of cat immature vitrified oocytes". *Cryobiology*, 98, pp. 181-186. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.11.003

Crespo, C., Gañán, N., Pulido, L., Osuna, G., Gomendio, M. y R. S. Roldán, E. R. (2007). “Conservación de tejidos y células de lince ibérico (*Lynx pardinus*), lince boreal (*L. lynx*) y lince rojo (*L. rufus*) para el establecimiento de un banco de recursos genéticos”. *Galemys. Boletín SCEM*, 19. ISSN: 1137-8700.

De los Santos Parejo, D. (2015). *Un análisis crítico de la conservación del lince ibérico en España, 1973-2015*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

De Paula Villaespesa, F. (2018). Programa de conservación ex-situ del lince ibérico. *Ambienta*, 124, pp. 94-115. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf%5FAM%2FPDF%5FAM%5FAmbienta%5F2018%5F124%5F94%5F115%2Epdf>. [Consultado: 19 -04 - 2021].

Dehnhard, M., Finkenwirth, C., Crosier, A., Penfold, L., Ringleb, J. y Jewgenow, K. (2012). “Using PGFM (13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2) as a non-invasive pregnancy marker for felids”. *Theriogenology*, 77(6), pp. 1088–1099. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.011

Dehnhard, M., Naidenko, S. V. y Jewgenow, K. (2017). “Metabolism of prostaglandin F2alpha in Eurasian lynx (*Lynx lynx*) and Asian leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilura*)”. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, pp. 45 – 51. DOI: 10.1111/rda.12894

Fernandez-Gonzalez, L. y Jewgenow, K. (2017). “Cryopreservation of feline oocytes by vitrification using commercial kits and slush nitrogen technique”. *Reproduction in Domestic Animals*, 52 (2), pp. 230–234. DOI: 10.1111/rda.12837

Finkenwirth, C., Jewgenow, K., Meyer, H. H. D., A. Vargas, A. y Dehnhard, M. (2010). “PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF2a) in pregnant and pseudo-pregnant Iberian lynx: A new noninvasive pregnancy marker for felid species”. *Theriogenology*, 73(4), pp. 530–540. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.008

Gañán, N., González, R., Garde, J. J., Martínez, F., Vargas, A., Gomendio, M. y R. S. Roldán, E. R. (2009). “Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*)”. *Reproduction, Fertility and Development*, 21, pp. 848–859. DOI: 10.1071/RD08226

Gañán, N., Sestelo, A., Garde, J. J., Martínez, F., Vargas, A., Sánchez, I., Pérez-Aspa, M. J., López Vao, J. V., Palomares, F., Gomendio, M. y R S Roldán, E. R. (2010). “Reproductive traits in captive

and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*)". *Reproduction*, 139(1), pp. 275–285. DOI: 10.1530/REP-09-0259

Garrote, G., de Ayala, R. P., Pereira, P., Robles, F., Guzman, N., García, J. F., Iglesias, C., Hervás, J., Fajardo, I., Simón, M. y Barroso, J. L. (2011). "Estimation of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) population in the Doñana area, SW Spain, using capture–recapture analysis of camera-trapping data". *European Journal of Wildlife Research*, 57, pp. 355–362. DOI: 10.1007/s10344-010-0440-7

Garrote, G., López, G., Bueno, J. F., Ruiz, M., de Lillo, S., y Simón, M. A. (2017). "Iberian lynx (*Lynx pardinus*) breeding in olive tree plantations". *Mammalia*, 81(4), pp. 405–409. DOI: 10.1515/mammalia-2015-0124

Göritz, F., Dehnhard, M., Hildebrandt, T. B., Naidenko, S. V., Vargas, A., Martinez, F., López-Bao, J. V. y Palomares, F. (2009). "Non-Cat Like Ovarian Cycle in the Eurasian and the Iberian Lynx – Ultrasonographical and Endocrinological Analysis". *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), pp. 87–91. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01380.x

Hryciuk, M. M., Braun, B. C., Bailey, L. D. y Jewgenow, K., (2019). "Functional and Morphological Characterization of Small and Large Steroidogenic Luteal Cells From Domestic Cats Before and During Culture". *Frontiers in Endocrinology*, 10:724. DOI: 10.3389/fendo.2019.00724.

IberLince (2018). Recuperación de la distribución histórica del Lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España y Portugal. Disponible en: http://www.iberlince.eu/index.php/esp/lince-iberico-esp/amenazas#.YHVY_y0lNao. [Consultado 13-04-2021].

Jewgenow, K., Painer, J., Amelkina, O., Dehnhard, M. y Goeritz, F. (2014). "Lynx reproduction – Long-lasting life cycle of corpora lutea in a feline species". *Reproductive biology*, 14(2) pp. 83-88. DOI: 0.1016/j.repbio.2014.03.002

Johnson, A. K. (2018). "Assisted Reproduction in the Male Cat". *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48(4) pp. 511-521 DOI: 10.1016/j.cvsm.2018.02.001

Jon Andrews, C. (2015). *The assessment of activity in colony-housed domestic cats (Felis catus)*. Trabajo de fin de máster. Universidad de Palmerstone North.

Lamberski, N. (2015). "Felidae". *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*, 8(47) pp. 467. DOI: 10.1016/B978-1-4557-7397-8.00047-5

León-Quinto, T., Simon, M. A., Cadenas, R., Jones, J., Martinez-Hernandez, F. J., Moreno, J. M., Vargas, A., Martinez, F. y Soria, B. (2009). "Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species". *Animal Reproduction Science*, 112, pp. 347–361. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.070

León-Quinto, T., Simón, M., Sánchez, Á., Martín, F. y Soria, B. (2011) "Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells". *Cryobiology*, 62(2), pp. 145–151. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.02.001

Luvoni, G.C. (2006). "Gamete cryopreservation in the domestic cat". *Theriogenology*, 66(1), pp. 101–111. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.012

MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico) (2021a). MITECO. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/red-parques-nacionales/boletin/programa-reintroduccion-lince-iberico.aspx>. [Consultado 10-04-2021].

MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico) (2021b). MITECO. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/censodelinceiberico2020_tcm30-526750.pdf. [Consultado 30-05-2021].

Müller, K., Koster, S., Painer, J., Söderberg, A., Gavier-Widèn, D., Brunner, E., Dehnhard, M. y Jewgenow, K. (2014). "Testosterone production and spermatogenesis in free-ranging Eurasian lynx (*Lynx lynx*) throughout the year". *European Journal of Wildlife Research*, 60(4), pp. 569–577. DOI: 10.1007/s10344-014-0821-4

Painer, J., Jewgenow, K., Dehnhard, M., Arnemo, J. M., Linnell, J. D. C., Odden, J., Hildebrandt, T. B. y Goeritz, F. (2014a). "Physiologically Persistent Corpora lutea in Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) – Longitudinal Ultrasound and Endocrine Examinations Intra-Vitam". *PLoS ONE*, 9 (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0090469

Painer, J., Goeritz, F., Dehnhard, M., Hildebrandt, T. B., Naidenko, S. V., Sánchez, I., Quevedo Muñoz, M. A. y Jewgenowa, K. (2014b). "Hormone-induced luteolysis on physiologically persisting corpora lutea in Eurasian and Iberian lynx (*Lynx lynx* and *Lynx pardinus*)". *Theriogenology*, 82, pp. 557–562. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.05.004

Painer, J. (2016). *Reproduction management in female Lynx (Lynx lynx)*. Tesis doctoral. Universidad de Berlín.

Pelican, K. M., Abaigar, T., Vargas, A., Rodríguez, J. M., Bergara, J., López, J., Vázquez, A., Chaparro, J. M., Brown, J. y Wildt, D. E. (2009). "Unusual gonadal hormone profiles in the Iberian lynx as determined by fecal monitoring". *Fundación Biodiversidad*. DOI: 10.20350/digitalCSIC/9069

Praxedes, É., A. Borges, A., V. O. Santos, M. y F. Pereira, A. (2018). "Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids". *Zoo Biology*, 37(4), pp. 258–263. DOI: 10.1002/zoo.21416

Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico (2021). Lynx ex-situ. Disponible en: <https://www.lynxexsitu.es/seccion.php?secc=NOTICIAS&id=113>. [Consultado 21-05-2021].

Rivas, A. *et al.*, (2016). "Manual de manejo de lince ibérico en cautividad". Disponible en: https://www.lynxexsitu.es/ficheros/documentos_pdf/84/Manual_Manejo_Lince_Iberico_2016.pdf. [Consultado 10-04-2021].

Sarmento, P., Carrapato, C., Eira, C., y Silva, J. P. (2019). "Spatial organization and social relations in a reintroduced population of Endangered Iberian lynx *Lynx pardinus*". *Oryx*, 53(2), pp. 344-355. DOI: 10.1017/S0030605317000370

Schwarzenberger, F. (2007). "The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species". *Internacional Zoo Yearbook*, 41(1), pp. 52–74. DOI: 10.1111/j.1748-1090.2007.00017.x

Senger, P. L. (2003). *Pathways to pregnancy and parturition*. (2a ed.) Washington: Current Conceptions, Inc.

Silva, A. R., Moreira, N., Pereira, A. F., Peixoto, G. C, Maia, K. M., Campos L. B. y Borges, A. A. (2017). "Estrus Cycle Monitoring in Wild Mammals: Challenges and Perspectives". *Theriogenology*, 21. DOI: 10.5772/intechopen.69444

Simón, M. *et al.* (2012). *Diez años de conservación del lince ibérico*. Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.

Stornelli, M. A. y Luzbel de la Sota, R. (2016). *Manual de reproducción de animales de producción y compañía*. Argentina: Edulp. Disponible en: https://click.endnote.com/viewer?doi=10.35537%2F10915%2F57873&token=WzIzOTEyMjYsljEwLjM1NTM3LzEwOTE1LzU3ODczIl0.idz-DKU_p54a0T897XAxniC0kTg. [Consultado: 22-03-2021].

Thongphakdee, A., Sukparangsi, W., Comizzoli, P. y Chatdarong, K. (2020). "Reproductive biology and biotechnologies in wild felids". *Theriogenology*, 150, pp. 360 – 373. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.004

IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (2021). The IUCN Red List of Threatened Species. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/12520/174111773> [Consultado 31-01-2021].

Vargas, A., Sánchez, I., Godoy, J., Roldán, E., Martínez, F., y Simón, MA. (2007). Plan de Acción para la cría en cautividad del lince ibérico: Cuarta edición. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. Disponible en: www.lynxexsitu.es. [Consultado 14-04-2021].

Villaverde, A. I., Fioratti, E. G., Penitenti, M., Ikoma, M. R., Tsunemi, M. H., Papa, F. O. y Lopes, M. D. (2013). "Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa". *Theriogenology*, 80(7), pp. 730–737. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.06.010

Vogt, K., Boos, S., Breitenmoser, U. y Kölliker, M. (2016). "Chemical composition of Eurasian lynx urine conveys information on reproductive state, individual identity, and urine age". *Chemoecology*, 29, pp. 205–217. DOI: 0.1007/s00049-016-0220-2

Zschockelt, L., Amelkina, O., Siemieniuch, M. J., Koster, S., Jewgenow, K. y Braun, B. C. (2014). "Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic

capacities during the luteal life span". *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 144, pp. 373–381. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.08.010

Zschockelt, L. (2016). *The contribution of steroids and prostaglandins to the lifespan of corpora lutea in domestic cats and lynxes*. Tesis Doctoral. Universidad de Berlín.